



TITLE:

Studies on the active site of chitosanase  
from *Paenibacillus fukuinensis* and its  
functional modification for utilizing  
chitosan( Digest\_要約 )

AUTHOR(S):

Isogawa, Danya

---

CITATION:

Isogawa, Danya. Studies on the active site of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis* and its functional modification for utilizing chitosan. 京都大学, 2014, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18331>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-07-01に公開

# Studies on the active site of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis* and its functional modification for utilizing chitosan

(*Paenibacillus fukuinensis* 由来キトサナーゼの活性部位の解析とキトサン利用に向けた機能改変)

生体高分子化学分野 五十川 團哉

近年の健康食品ブームの中で、関節痛などの解消に効果があるとして注目されているのがグルコサミンである。グルコサミンは甲殻類の殻に含まれるキトサンという天然多糖を形成している単糖であり、抗菌活性やコレステロール低下作用など、様々な生理活性が確認されている有用物質である。このような生理活性は、キトサンを分解して得られる単糖、二糖のような短い糖はもちろんのこと、六糖程度のオリゴ糖においてもその活性はとりわけ高いことも明らかになっている。

カニの名産地として有名な福井県の農家では、「食べた後のカニ殻を畑にまくことによって、作物の生産が良くなる」ことが昔から伝承され、慣習的に養土に用いられてきている。この点に注目し、その土壌からスクリーニングされた *Paenibacillus fukuinensis* は、キチンを分解するキチナーゼおよび、キトサンを分解するキトサナーゼの両方を分泌する非常に珍しい菌株である。さらに、*P. fukuinensis* 由来キトサナーゼは、キトサナーゼ活性に加えて、グルカナーゼ活性を有する二機能性酵素であることがわかった。糖質加水酵素の分類法で本酵素は、キトサナーゼが分類される Family 46 ではなく、Family 8 のグルカナーゼのグループに分類されることから、グルカナーゼが進化することでキトサナーゼ活性を有するようになったのではないかと考えた。進化について考察を行う際に重要となるのが、これら 2 つのファミリー間で大きく異なる proton acceptor に相当するアミノ酸残基である。加水分解酵素は、触媒部位として proton donor と proton acceptor の働きによって基質を加水分解することが知られているが、この proton acceptor に相当するアミノ酸残基の機能によって活性の多様性が現れる可能性が考えられる。そこで、本酵素の proton acceptor 部位について、同じ Family に属しながら活性の様式が異なる他の酵素と比較することで proton acceptor 部位の解析を行った。

また、化学法では分解物のコントロールができないため不可能であった特定の鎖長の糖の選択的取得を目指して本酵素の基質結合に関わるアミノ酸残基の評価を行い、分解様式の改変を行った。

これらの結果をまとめると、以下の結論が得られた。

1. 酵母細胞表層ディスプレイ法を用いて *P. fukuinensis* 由来キトサナーゼをディスプレイすることで酵母細胞表層上で簡便に、かつ迅速にキトサナーゼの改変が可能となった。
2. *P. fukuinensis* 由来キトサナーゼの proton acceptor 解明のため、網羅的に変異導入を行った変異体ライブラリー構築を行い、Glu302 が活性中心のアミノ酸残基として機能し、同様に Asn312 についても補助として機能していることを明らかにした。
3. *P. fukuinensis* 由来キトサナーゼの基質結合に関わるアミノ酸残基についての評価を行い (図 1)、基質分解に関わるアミノ酸残基の重要性について分析を行った結果、Trp228 は活性には直接的に関わっていないが、このアミノ酸残基の機能改変で六糖分解の様式への影響があることを解明した (図 2)。化学法では単糖にまで分解されてしまうが、酵素法を用いた今回のような変異導入により、本来の酵素の分解様式から二糖への選択的生成へのシフトを確認できた。

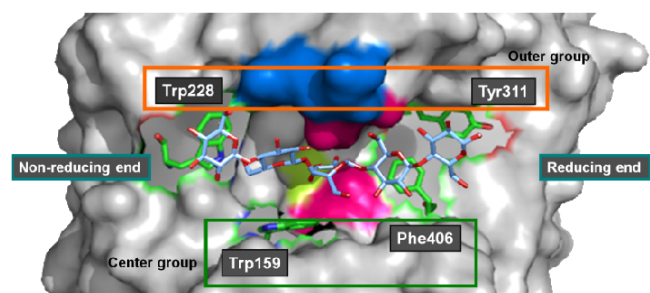


図 1 キトサナーゼの触媒クレフトと基質結合部位

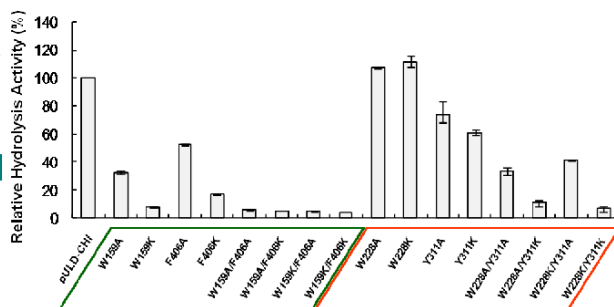


図 2 キトサナーゼ変異体の活性